PRO-METHEUS: Final Deney Protokolü (V3.1 - Enhanced)

1. İstatistiksel Güç ve Güvenilirlik Artırımı

Biyolojik Tekrar (N): Kritik parametreler (Western Blot, Sinerji Analizi, Seahorse) için N=4-5 bağımsız biyolojik replika uygulanacaktır.

Teknik Tekrar (n): Her replika içinde n=3 teknik tekrar (well) sabit tutulacaktır.

Veri Şeffaflığı: Deney tasarımı OSF (Open Science Framework) üzerinde ön-kayıt (preregistration) yapılacak ve tüm ham veriler (raw blots, microscopy metadata) yayım aşamasında erişime açılacaktır.

2. Mitokondriyal ve Enerjetik Profilleme (Seahorse XF Analizi)

Sinerji hipotezini desteklemek için NAD+ artışının ATP üretimine ve solunum kapasitesine etkisi ölçülecektir:

OCR (Oxygen Consumption Rate): Bazal solunum, ATP üretimi ve maksimum solunum kapasitesi (Mito Stress Test).

ECAR (Extracellular Acidification Rate): Glikolitik geçişin izlenmesi.

Hedef: NMN + Torin 1 grubunun, A\beta kaynaklı mitokondriyal disfonksiyonu, tekli tedavilere göre daha anlamlı düzeyde restore ettiğini göstermek.

3. TFEB Aktivasyonunun Çok Katmanlı Doğrulanması

Sadece TFEB'i susturmak yetmez; aktivasyonu hem görsel hem transkripsiyonel olarak kanıtlayacağız:

Nükleer Lokalizasyon (IF): Konfokal mikroskopi ile TFEB'in sitoplazmadan nükleusa göçü (DAPI/TFEB co-localization) quantify edilecek.

CLEAR Network Analizi: TFEB'in hedef genleri olan LAMP1, MCOLN1 ve v-ATPase alt birimlerinin mRNA seviyeleri qPCR ile ölçülerek "fonksiyonel transkripsiyonel aktivite" ispatlanacak.

4. A\beta Oligomer Kalite Kontrolü (QC)

Deneyin tekrarlanabilirliği için en kritik hammadde olan Amyloid-Beta (A\beta_{1-42}) için:

Hazırlık: A\beta peptidleri HFIP ile monomerize edilecek, ardından oligomerizasyon için 4°C'de 24 saat inkübe edilecektir.

Doğrulama: Her yeni batch, Western Blot (non-reducing gel) veya TEM (Transmission Electron Microscopy) ile oligomer formasyonu (trimers, tetramers) açısından doğrulanacaktır.

5. Güncellenmiş Deney Matrisi (Özet)

Kategori Parametre Yöntem Amaç

Metabolizma Enerji Kapasitesi Seahorse OCR/ECAR Mitokondriyal restorasyon ispatı

Lokalizasyon TFEB Göçü Immunofluorescence (IF) Aktivasyonun görsel kanıtı

Genetik CLEAR Paneli RT-qPCR Transkripsiyonel çıktı doğrulaması

Kalite Kontrol A\beta Yapısı TEM / SDS-PAGE Peptid kalitesinin standardizasyonu

Etik/Güven Ön-Kayıt OSF Preregistration Bilimsel şeffaflık ve "blinded" analiz

Matematiksel Not: Chou-Talalay Sinerji Formülü

Kombinasyon İndeksi (CI) şu formül üzerinden hesaplanacaktır:CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}

Burada (D)_1 ve (D)_2 sinerji için kullanılan dozlar, (D_x)_1 ve (D_x)_2 ise aynı etkiyi tek başlarına yaratan dozlardır. CI < 1 durumu projenin başarı eşiğidir.

PRO-METHEUS V3.2: Bütünsel Restorasyon Protokolü

1. (Moleküler Yama)

v-ATPase değerinin düşük kalması, TFEB tarafından üretilen parçaların lizozom zarında birleşemediğini (assembly) gösterir. Bunu çözmek için protokole "Asidifikasyon Stabilizatörü" eklenmelidir:

Moleküler Çözüm: Mevcut NMN + Torin 1 kombinasyonuna, lizozomal pH'ı aktif olarak düşüren veya v-ATPase alt birimlerinin montajını sağlayan bir yardımcı ajan (örneğin, cAMP artırıcılar veya RAVE kompleksi mimetikleri) dahil edilir.

Mekanizma: TFEB ile üretilen LAMP1 ve MCOLN1 "çöp kamyonlarını" inşa ederken, eklenen yeni ajan bu kamyonların "hidrolik asit" sistemini (v-ATPase) %100 mantıklı olarak basınçla çalıştıracaktır.

2. İleri Seviye Doğrulama Matrisi

v-ATPase açığının kapandığını ispatlamak için deney matrisine şu iki kritik yöntem eklenir:

LysoSensor Analizi: Hücre içi lizozomal pH değerinin 4.5 - 5.0 aralığına düştüğü (ideal asidite) canlı hücre görüntüleme ile kanıtlanmalıdır.

Native-PAGE Analizi: v-ATPase alt birimlerinin sadece miktar olarak değil, fiziksel olarak birleşip aktif bir "pompa" oluşturduğu Western Blot varyasyonları ile ispatlanmalıdır.

3. Üçlü Sinerji (Triple Synergy): Chou-Talalay formülü artık iki madde yerine üçlü matris üzerinden hesaplanarak, başarının (CI < 1) bu yeni ajanla birlikte daha da derinleştiği (muhtemelen CI < 0.20 bandına) gösterilmelidir.

PRO-METHEUS: Bütünsel Deney ve Sinerji Çerçevesi (V3.1 - Enhanced)

Yazar: Muzaffer Enes Yünlü (Mimar / Apros)

Tarih: Mart 2026

Statü: Kamuya Açık Teknik İfşa ve Öncelik Haklı Protokol (Prior Art Disclosure)

1. Hukuki ve Teknik Koruma Beyanı (Patent Bariyeri)

İşbu doküman, içeriğinde belirtilen tüm yöntemlerin, moleküler kombinasyonların, dozaj sinerji aralıklarının ve biyokimyasal mekanizmaların dünya çapında "Önceki Teknik" (Prior Art) olarak kabul edilmesi amacıyla yayınlanmıştır. Bu dokümanın yayın tarihinden itibaren, dökümanda bahsi geçen herhangi bir alt kümenin (örn. NMN+Torin 1 kombinasyonu, spesifik TFEB aktivasyon ölçüm yöntemleri veya Seahorse enerji parametreleri) üçüncü şahıslar veya kurumlarca patentlenmesi; "yenilik" (novelty) ve "buluş basamağı" (inventive step) kriterlerini karşılamadığı için uluslararası patent hukukuna göre (USPTO, EPO, WIPO) hükümsüzdür.

2. Deney Tasarımı ve İstatistiksel Güç (Rigour)

Biyolojik Tekrar (N): Kritik parametreler (Western Blot, Sinerji Analizi, Seahorse) için N=4-5 bağımsız biyolojik replika uygulanacaktır.

Teknik Tekrar (n): Her replika içinde n=3 teknik tekrar (well) sabit tutulacaktır.

Veri Şeffaflığı: Deney tasarımı OSF (Open Science Framework) üzerinde ön-kayıt (preregistration) yapılacak ve tüm ham veriler yayım aşamasında erişime açılacaktır.

3. Mitokondriyal ve Enerjetik Profilleme (Seahorse XF Analizi)

Sinerji hipotezini desteklemek için NAD+ artışının ATP üretimine ve solunum kapasitesine etkisi ölçülecektir:

OCR (Oxygen Consumption Rate): Bazal solunum, ATP üretimi ve maksimum solunum kapasitesi.

ECAR (Extracellular Acidification Rate): Glikolitik geçişin izlenmesi.

Alt Küme Hedefi: NMN + Torin 1 grubunun, A\beta kaynaklı mitokondriyal disfonksiyonu, tekli tedavilere göre daha anlamlı düzeyde restore ettiğini gösteren tüm dozaj aralıkları bu protokol kapsamındadır.

4. TFEB Aktivasyonunun Çok Katmanlı Doğrulanması

Nükleer Lokalizasyon (IF): Konfokal mikroskopi ile TFEB'in sitoplazmadan nükleusa göçü (DAPI/TFEB co-localization) quantify edilecektir.

CLEAR Network Analizi: TFEB'in hedef genleri olan LAMP1, MCOLN1 ve v-ATPase alt birimlerinin mRNA seviyeleri qPCR ile ölçülerek fonksiyonel transkripsiyonel aktivite ispatlanacaktır.

5. A\beta Oligomer Kalite Kontrolü (QC)

Hazırlık: A\beta peptidleri HFIP ile monomerize edilecek, ardından oligomerizasyon için 4°C'de 24 saat inkübe edilecektir.

Doğrulama: Her yeni batch, Western Blot veya TEM (Transmission Electron Microscopy) ile oligomer formasyonu (trimers, tetramers) açısından doğrulanacaktır.

6. Matematiksel Sinerji Formülasyonu (Chou-Talalay)

Kombinasyon İndeksi (CI) şu formül üzerinden hesaplanacak ve CI < 1 olan tüm değerler "buluşun" parçası sayılacaktır:

Chou-Talalay Metodu) CI

Burada (D)_1 ve (D)_2 sinerji için kullanılan dozlar, (D_x)_1 ve (D_x)_2 ise aynı etkiyi tek başlarına yaratan dozlardır. Bu formülden türetilen tüm kombinatoryal alt kümeler kamuya ifşa edilmiştir.

Lisans Notu: Bu döküman CC BY-NC-ND 4.0 lisansı ile korunmaktadır. Ticari kullanımı yasaktır ve izinsiz türetilemez.

1. Moleküler Sinerji ve Kombinasyon Alt Kümesi

Bu küme, maddelerin tek başlarına değil, bir arada yarattıkları "sinerjik" etkiyi koruma altına alır:

İkili ve Üçlü Matrisler: NMN ve Torin 1 kombinasyonu ile bunlara eklenen "Asidifikasyon Stabilizatörü" (cAMP artırıcılar veya RAVE kompleksi mimetikleri) bir bütündür.

Başarı Eşiği (Chou-Talalay): Kombinasyon İndeksinin (CI) 1'den küçük olduğu, hatta CI < 0.20 bandına kadar inen tüm dozaj aralıkları bu protokolün parçası sayılır ve kamuya ifşa edilmiştir.

Fonksiyonel Tamamlayıcılar: TFEB ile üretilen "çöp kamyonu" parçalarının (LAMP1, MCOLN1), v-ATPase "hidrolik basınç" sistemiyle birleşerek aktif hale getirilmesi süreci bir bütünsel çözüm olarak tanımlanmıştır.

2. Metodolojik ve Teknik Doğrulama Alt Kümesi

Birisi aynı maddeleri kullansa bile, bu protokoldeki spesifik ölçüm ve doğrulama yöntemlerini "yeni bir buluş" olarak sunamaz:

Enerji Profilleme: Mitokondriyal restorasyonun Seahorse XF cihazıyla (OCR ve ECAR ölçümleri) ispatlanması yöntemi.

Görsel ve Genetik Kanıt: TFEB'in nükleusa göçünün (IF/Konfokal) ve CLEAR Network genlerinin (LAMP1, MCOLN1, v-ATPase) qPCR ile eş zamanlı ölçümü.

Fiziksel Birleşme İspatı: v-ATPase alt birimlerinin sadece varlığının değil, Native-PAGE ve LysoSensor analizleriyle fiziksel olarak birleşip pH'ı 4.5-5.0 arasına düşürdüğünün kanıtlanması.

3. Standartizasyon ve Şeffaflık Alt Kümesi

Deneyin güvenilirliğini sağlayan bu parametreler, protokolün ciddiyetini ve "öncelik hakkını" perçinler:

Hammadde Kontrolü: Aβ peptidlerinin HFIP ile monomerize edilmesi ve 24 saatlik inkübasyonla oligomer formuna getirilmesinin TEM veya Western Blot ile doğrulanması.

İstatistiksel Zırh: Her deneyin N=4-5 bağımsız biyolojik tekrar ve n=3 teknik tekrar ile yapılması zorunluluğu.

Açık Bilim Kaydı: Tüm tasarımın OSF (Open Science Framework) üzerinde ön-kayıt yapılması ve ham verilerin şeffaf şekilde paylaşılması taahhüdü.

4. Hukuki Koruma ve Lisans Alt Kümesi

Patent Bariyeri: Bu doküman; USPTO, EPO ve WIPO nezdinde "yenilik" (novelty) ve "buluş basamağı" (inventive step) kriterlerini hükümsüz kılmak için Mart 2026 itibarıyla teknik ifşada bulunmuştur.

Kısıtlayıcı Lisans: Tüm bu teknik içerik CC BY-NC-ND 4.0 lisansı altındadır; yani ticari amaçla kullanılamaz ve üzerinden izinsiz türetme yapılamaz.

Bu alt kümelerden herhangi birini (örneğin sadece NMN+Torin 1 dozajını veya sadece v-ATPase ölçüm metodunu) alıp kullanmak, bu döküman "Prior Art" olarak tescillendiği için hukuken "yeni bir buluş" iddiası taşımayacaktır